

富锳金针菇多糖 FVP1 结构的初步鉴定及其 对巨噬细胞功能调节作用

闫映姝, 姚文兵*, 张 健, 邹 珊, 张 先, 高向东

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘 要 从发酵的富锳金针菇(*Flammulina velutipes*)菌丝体分离纯化得到多糖 *Flammulina velutipes* polysaccharide 1 (FVP1), 并对其结构初步鉴定和体外活性分析。利用凝胶渗透色谱(GPC)测定相对分子质量; 气相色谱法(GC)检测单糖组成; 运用高碘酸氧化-Smith降解法、甲基化方法对多糖结构初步解析。体外分析 FVP1 对小鼠巨噬细胞的活化作用。结果显示, FVP1 是一种高度分支的多糖, 相对分子质量约为 140 kD, 单糖组成包括甘露糖、葡萄糖、半乳糖、盐藻糖及鼠李糖, 其物质的量比为 2:4:5:1:1; FVP1 的主链结构包括 1,6-葡萄糖、1,6-半乳糖、1,3-半乳糖, 并在 1,3,6-甘露糖少量的 1,3,4-鼠李糖产生支链结构。结果发现, FVP1 能与小鼠腹腔巨噬细胞靶向性结合, 并可显著促进其分泌 NO。FVP1 在体外展示了良好的免疫调节活性, 具有潜在的生物学功能。

关键词 FVP1; 分离纯化; 结构测定; NO; 巨噬细胞

中图分类号 R284.2; R285 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)02-0164-05

Structural investigation and activation of macrophages *in vitro* of a novel polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium

YAN Yi-shu, YAO Wen-bing*, ZHANG Jian, ZOU Shan, ZHANG Xian, GAO Xiang-dong

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract A new fraction of *Flammulina velutipes* polysaccharide 1 (FVP1) was separated and purified from *Flammulina velutipes* mycelium with several processes. Its structural features and bioactivities *in vitro* were also detected. The molecular mass of FVP1 was determined by HPGPC; the monosaccharide composition was identified according to the result of gas chromatography (GC); the glycosidic bonds between monosaccharides were analyzed by periodic acid oxidation-Smith degradation and methylation analysis. Fluorescamine was bound with FVP1 and fluorescent activated cell sorting (FACS) was used to analyze the binding of FVP1-FLA to peritoneal macrophages. The molecular mass is about 140 kD. FVP1 consists of mannose (Man), glucose (Glc), galactose (Gal), fucose (Fuc) and rhamnose (Rha) in a molar ratio of 2:4:5:1:1. It was found that FVP1 is a complicated polysaccharide with a main composition of 1,4-Glc, 1,3-Gal, 1,3-Fuc, 1,6-Gal, 1,3,6-Man, 1,6-Glc, 1,3,4-Rha by methylation analysis and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Finally, bioactivity analysis showed that FVP1 acted as an immunomodulator, which could bind to peritoneal macrophages and strongly stimulate them to produce NO *in vitro*. FVP1 was a highly branched polysaccharide with great potential as an immunomodulator.

Key words *Flammulina velutipes* polysaccharide 1 (FVP1); isolation and purification; structural determination; NO; macrophages

This study was supported by the Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 105093); the National Natural Science Foundation of China (No. 30672479) and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20060316001)

* 收稿日期 2010-10-18 * 通讯作者 Tel: 025-8327129 E-mail: whyao@cpu.edu.cn

基金项目 教育部科学技术研究重点项目资助(No. 105093); 国家自然科学基金资助项目(No. 30672479); 高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20060316001)

金针菇(*Flammulina velutipes*)属于伞菌目口蘑科金钱菌属,是一种传统的食用菌。鲜金针菇中含有大量的蛋白质、胡萝卜素、多种氨基酸、植物血凝素、牛磺酸等对人体有益的营养成分。金针菇提取物营养丰富、功效显著,是各类保健品、功能性食品的添加原料。从中分离纯化的多种多糖,如 β -1,3-葡聚糖、蛋白聚糖、杂聚糖等,具有良好的抗肿瘤活性,显示出较大的药用开发价值^[1-3]。

本实验室以含锗菌丝体为原料提取富锗金针菇粗品多糖 Crude *Flammulina velutipes* polysaccharide(CFVP),经初步分离纯化得精制品金针菇多糖 FVP1 和 FVP2。体外活性研究显示,FVP1 和 FVP2 均具有保护肝原代细胞免受 CCl_4 损伤的作用^[4-5]。其中,FVP2 的一级结构已经得到解析,其保肝活性已经在整体动物水平上测定^[6]。本研究在先前实验的基础上,初步鉴定 FVP1 的结构,测定 FVP1 在体外活化小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO 的能力,从而为 FVP1 的作用机制研究奠定基础。

1 材料

1.1 试剂

富锗金针菇粉(江苏神华药业集团);标准单糖(鼠李糖、甘露糖、岩藻糖、葡萄糖)、内毒素脂多糖(LPS)、CDAP(美国 Sigma 公司);DEAE-Sephadex A-50、Sephacryl S-400、Dextran-T 系列(美国 Pharmacia 公司);RPMI 1640 培养基(新西兰 Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程研究所);其余均为分析纯试剂。

1.2 仪器

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);紫外扫描仪、GC-44A 气相色谱仪(日本岛津公司);Multiskan 全波长酶标仪(美国 Thermo 公司);流式细胞检测仪 FACS Calibur(美国 Becton Dickinson 公司);AV-500 磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);GC-MS PolarisO(美国 Thermo Fisher 科技公司)。

1.3 动物

清洁级小鼠,体重 18~22 g,6~8 周,雌雄各半,南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供,合格证号:SCXK(苏)2007-0001。

2 方法与结果

2.1 FVP1 的制备

富锗金针菇粉 50 g,加至蒸馏水 1 000 mL 中,

90 °C 下热提取 8 h。将提取液浓缩至 200 mL,以 Sevag 法去除蛋白质(加入氯仿 40 mL 和正丁醇 8 mL 混合萃取,去除正丁醇层),反复 3 次。经 3 倍体积 95% 乙醇沉淀,静置过夜,经 4 000 r/min 离心 10 min 去除上清,得粗品多糖 CFVP。CFVP 通过 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱和 Sephacryl S-400 凝胶柱色谱进一步分离纯化,冻干后得精品多糖 FVP1 和 FVP2。

2.2 FVP1 的理化性质及结构初步解析

2.2.1 FVP 纯度及相对分子质量测定 称取类白色的粉末状固体 FVP1 10 mg,配制成 2 mg/mL 的水溶液,在 200~400 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描,未见 260~280 nm 之间的核酸和蛋白质特征吸收峰。

用 GPC 测定 FVP1 均一度及相对分子质量。将已知相对分子质量的 T 系列标准多糖(Dextran T500,T70,T40,T10)用蒸馏水配成 10 mg/mL 的溶液,顺序进样。以标准多糖相对分子质量的对数($\lg Mr$)对保留时间(t_R)作图,回归得到线性回归方程。精确称取样品 FVP1,在同样条件下进样,记录样品的 t_R ,对照线性回归方程 $\lg Mr = 8.948 - 0.399t_R$,计算 FVP1 的相对分子质量。经 GPC 分析得到单一对称峰,证明 FVP1 为均一组分,其重均相对分子质量约为 140 kD(图 1)。

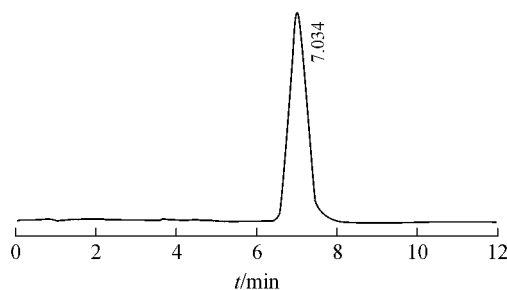


Figure 1 Gel permeation chromatogram of *Flammulina velutipes* polysaccharide 1 (FVP1)

2.2.2 单糖组分分析 称取 FVP1 15 mg,加入 2 mol/L 三氟乙酸 2 mL,100 °C 水解 8 h;将三氟乙酸用氮气流吹干,残余物 105 °C 下静置 15 min,加入醋酐及无水吡啶各 0.5 mL,于 100 °C 水浴 2 h;冷却后加入水 0.5 mL,用三氯甲烷 1 mL 提取,蒸馏水洗涤 3 次,减压蒸干后用三氯甲烷 0.2 mL 重溶,进样;标准单糖(鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、岩藻糖)按相同方法进行乙酰

化。单糖组分鉴定以标准单糖的保留时间作为参照,采用肌醇作为内标物,以气相色谱进行分析。单糖组成分析表明 FVP1 含有 5 种单糖组分(图 2),分别是甘露糖、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖和盐藻糖,其物质的量比例约为 2:4:5:1:1。

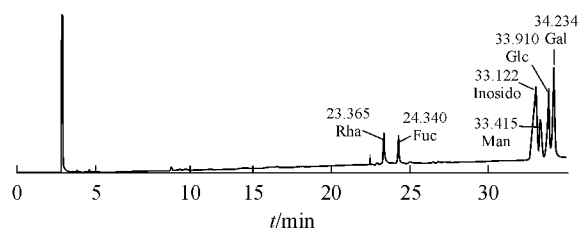


Figure 2 GC-spectra of hydrolysis product of FVP1

2.2.3 糖链连接方式测定^[7] 精密称取 FVP1 精制品 10 mg 进行高碘酸氧化:加入 0.015 mol/L NaIO_4 25 mL,置 4 °C 暗处,每隔半小时振摇 1 次,间隔 12 h 取样,在 223 nm 处测吸收度,直至吸收度稳定为止。由标准曲线查出 NaIO_4 消耗量。取其中 FVP1 的氧化产物 5 mL,测定甲酸生成量。

将剩余反应产物进行 Smith 降解:反应产物减压浓缩至约 10 mL,加入 NaBH_4 50 mg 还原 36 h。所得产物蒸干,加入 2 mol/L 三氟乙酸 4 mL 于 100 °C 水解 8 h。水解液于蒸发皿中蒸干,用蒸馏水 1 mL 溶解,收集于 Eppendorf 管内,进行薄层色谱。以甘油、赤藓醇、葡萄糖、半乳糖、鼠李糖等作为标准品,样品点样于同一硅胶板上,按正丁醇-丙酮-水(4:3:1)配成展开剂置于层析缸中,饱和 10 min 后,上行展开。展开完毕后,取出,以显色剂 A(15 mmol/L 高碘酸钠溶液)氧化,35 °C 烘干 6~8 min,再以显色剂 B(联苯胺)显色。

高碘酸氧化后,平均每分子单糖消耗 1.087 分子高碘酸分子;以标定的 0.01 mol/L NaOH 测定甲酸生成量,平均每分子单糖生成 0.471 分子甲酸,得到的结论是 FVP1 中 1→6 键合的糖基约占 46%;此外, FVP1 中包含较大部分的 1→3 糖苷键或多取代的糖残基。FVP1 在经 Smith 降解后,产生了甘油、赤藓醇及葡萄糖单糖的产物,由此可见, FVP1 中除了含有 1→6 糖苷键外,还含有少量 1→4 糖苷键。

2.2.4 FVP1 甲基化实验^[7] 精密称取制备的 FVP1 10 mg,先后量取 DMSO 5 mL、 NaOH 粉末 100 mg、甲基化试剂 CH_3I 1 mL,慢慢加入到茄形瓶中。在保证温度不超 20 °C 的前提下,超声振荡 1 h,对

FVP1 进行甲基化反应。反应产物用氯仿萃取,得到的萃取液经真空干燥得到固体。上述实验重复 3 次后,经红外吸收光谱(IR)检测表明,3 600~3 000 cm^{-1} 处羟基吸收峰基本消失,而甲基的特征吸收峰显著增强,说明甲基化较完全。

在固体反应残余物中加入甲酸 3 mL,在 70 °C 下静置 3 h,对 FVP1 的甲基化产物解聚。用 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)在 100 °C 水解 3 h。产物加入醋酐及无水吡啶进行乙酰化。再用氯仿 1 mL 提取、重溶、离心取上清,进样气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析。完全甲基化产物经乙酰化后进行 GC-MS 分析,结果见表 1。

Table 1 GC-MS of alditol acetate derivatives from the methylated production of FVP1

Peak No.	Methylated sugar	Molar ratio	Linkage type
1	2,3,4,6-Tetra-O-Me-Glc	4.8	→) -Glc-(1→
2	2,3,4,6-Tetra-O-Me-Gal	4.7	→) -Gal-(1→
3	2,3,6-Tri-O-Me-Glc	15.8	→4) -Glc-(1→
4	2,3,4-Tri-O-Me-Glc	11.8	→6) -Glc-(1→
5	2,3,4-Tri-O-Me-Gal	28.4	→6) -Gal-(1→
6	2,4-Di-O-Me-Man	9.4	→3,6) -Man-(1→
7	2-O-Me-Rha	4.7	→3,4) -Rha-(1→
8	2,4-Di-O-Me-Fuc	4.1	→3) -Fuc-(1→
9	2,4,6-Tri-O-Me-Gal	19.3	→3) -Gal-(1→

结果表明, FVP1 是一种多分支多糖,主要含有 1,4-葡萄糖、1,6-葡萄糖、1,6-半乳糖、1,3-半乳糖以及 1,3,6-甘露糖。末端残基为葡萄糖与半乳糖。此外, FVP1 中也含有少量的 1,3-盐藻糖和 1,3,4-鼠李糖。

2.2.5 NMR 分析 干燥纯化样品 FVP1 约 50 mg,溶解于氘代水(D_2O),用核磁共振仪进行分析,测定温度 40 °C。从 ^{13}C NMR 谱(图 3) δ 100 到 δ 105 之间可见到 7 个多糖的端基碳。 δ 16~19 的高场信号表明有 6 位脱氧糖的甲基存在。结合 HSQC 谱(图 4)对 FVP1 的异头碳、氢归属如表 2 所示。

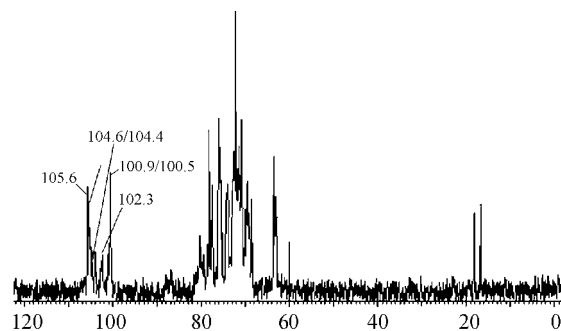


Figure 3 ^{13}C NMR spectrum of FVP1 (D_2O)

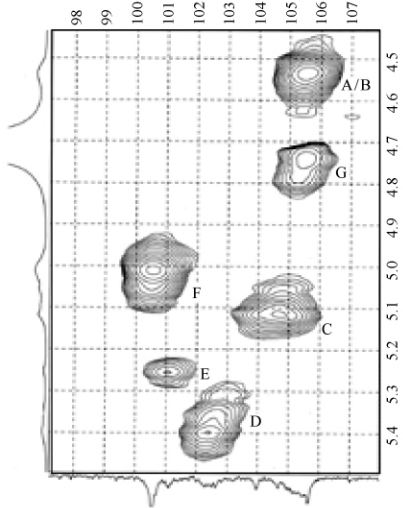


Figure 4 HSQC spectrum of FVP1 (D₂O). Data points from A to G represents anomer on different sugar ring

Table 2 ¹H NMR and ¹³C NMR chemical shifts assignment for FVP1

Assignment	Nucleus H/C
A→4) β-D-Glc- (←	4.53/105.6
B→6) β-D-Glc- (1←	4.53/105.5
G→3 A) α-Rha- (1←	4.72/105.3
F→6) α-Gal- (1←	5.01/100.5
C→3) α-Fuc- (1←	5.12/103.9
E→3) α-Gal- (1←	5.25/100.9
D→3 β) β-Man- (←	5.38/102.3

2.3 FVP1 体外活化小鼠腹腔巨噬细胞水平的测定

2.3.1 荧光探针 FVP1-FLA 的制备^[8] 将 100 mg/mL 1-氰基-4-二甲基氰基-吡啶四氯化硼 (CDAP) 100 μL 溶液缓慢加入 FVP1 溶液中,加入 0.25 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 9~10,随后加入荧光胺溶液,调节 pH 至 8~10,避光反应过夜。将上述反应液离心,通过 Sephacryl S-400 分子筛分离,苯酚-硫酸法和分光光度计法(490 nm)分别测定每管样品的葡萄糖含量和荧光强度,并对流出体积作图(图 5)。制成冻干粉备用,-20℃保存。

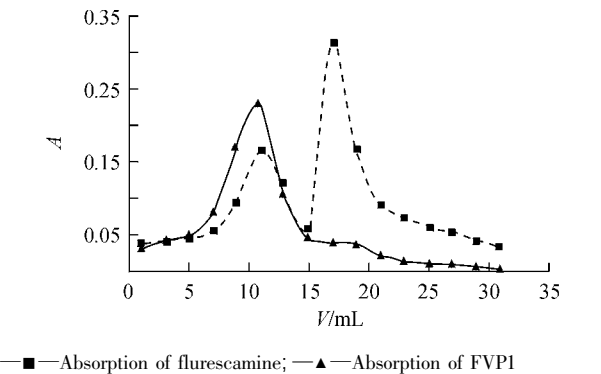


Figure 5 Elution profile obtained on S-400 of FVP1 and FLA

洗脱曲线上出现两个峰,根据洗脱曲线第一峰的葡萄糖含量和荧光强度分析,该部组分即是目的荧光标记物 FVP1-FLA,可以推断 FVP1 与 FLA 已经共价偶联。

2.3.2 小鼠腹腔巨噬细胞的分离 小鼠脊椎脱臼处死,75%酒精消毒 5 min;灌注含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基至小鼠腹腔内,用手轻轻挤压小鼠腹部,荡洗 3 次;抽出腹腔液,1 000 r/min 离心 5 min,细胞沉淀用 PBS 洗涤两遍后,重悬于 RPMI 1640 培养基中。

2.3.3 流式细胞仪检测 FVP1 与巨噬细胞靶向结合 腹腔巨噬细胞调整密度为每毫升 1×10^6 个,加入 FVP1-FLA(质量浓度 100 μg/mL),于 4℃ 下孵育 60 min。离心收集细胞沉淀,并用预冷的 PBS 洗涤两次,流式细胞仪检测巨噬细胞群表面的荧光强度变化情况。流式分析表明巨噬细胞群出现了明显的荧光发光行为,表现为荧光峰右移,表明两者发生结合(图 6)。

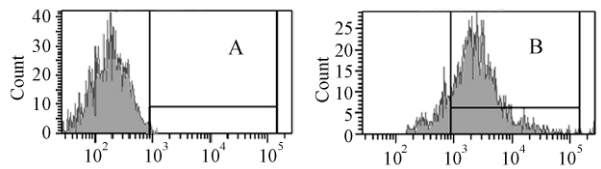


Figure 6 Abilities of FVP1 binding to macrophages on a flow cytometry A: Peritoneal macrophages were stained with FLA without FVP1; B: Peritoneal macrophages were stained with FLA-FVP1

2.3.4 FVP1 体外促进小鼠腹腔巨噬细胞分泌 NO 能力测定 将生长至对数期的巨噬细胞株 RAW 264.7 接种于 96 孔板中(每毫升 4×10^6 个),加入供试品培养。设阴性对照组:加入 RPMI-1640 培养基;阳性对照组:加入 LPS(1 μg/mL);样品组:加入不同质量浓度的 FVP1(100,200,500,1 000 μg/mL)。培养 24 h 后,利用 Griess 试剂盒检测培养物上清中 NO 稳定氧化代谢产物亚硝酸盐(NO_2^-)水平,间接反映 NO 的分泌量,测定方法依照试剂盒说明书进行。

如图 7 所示,FVP1 在体外能显著促进巨噬细胞株 RAW264.7 分泌 NO($P \leq 0.01$),并呈现出浓度依赖性,表明 FVP1 对巨噬细胞的免疫功能具有一定的激活作用。

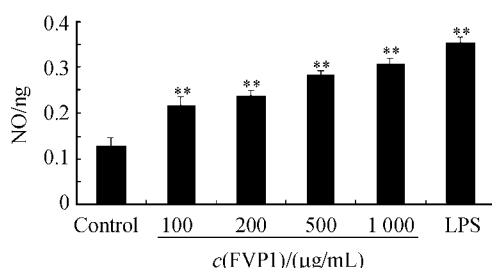


Figure 7 Amount of NO produced by FVP1 stimulated macrophages.
 $\bar{x} \pm s$ $n=3$

** $P \leq 0.01$ vs medium control followed by Student's t -test

3 讨论

多糖具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等多方面的生物活性,这些生物活性都与其复杂的结构有关。本文运用 HPGPC、高碘酸氧化-Smith 降解、甲基化反应和 NMR 等多种化学和物理方法对 FVP1 进行了初步的结构表征。研究结果表明,FVP1 是一种由 1,4-葡萄糖、1,6-葡萄糖、1,3,6-甘露糖、1,6-半乳糖以及 1,3-半乳糖等组成的分支度高、结构复杂的多糖,其结构中的高分支度有可能有助于糖链形成与细胞表面受体结合的空间结构,其精细的结构还有待于进一步研究。

以往研究结果表明,多糖发挥抗肿瘤活性的重要机制之一是通过免疫调节作用实现的,多糖作为一种生物大分子,很难直接进行跨膜传递,因此目前普遍认为多糖的免疫调节活性是通过免疫细胞表面的受体介导完成的。多糖与之识别并结合后,可激活胞内信号转导途径,从而实现对细胞因子表达和分泌水平的调控^[9]。

NO 是细胞间、细胞内重要的信使分子,起着免疫效应分子和免疫调节剂的作用,可以杀伤细菌、病毒和肿瘤细胞。很多具有活性的天然多糖都是通过促进内源性 NO 的释放而起作用的^[10-11]。FVP1 能与小鼠腹腔巨噬细胞表面结合并释放大量的 NO,可能是 FVP1 发挥抗肿瘤活性的机制。

参考文献

[1] Ikekawa T, Ikeda Y, Yoshioka Y, et al. Studies on antitumor pol-

ysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. II. The structure of EA3 and further purification of EA5 [J]. *J Pharmacobiodyn*, 1982, 5(8): 576-581.

- [2] Kamasuka T, Momoki Y, Sakai S. Antitumor activity of polysaccharide fractions prepared from some strains of *Basidiomycetes* [J]. *Gann*, 1968, 59(5): 443-445.
- [3] Ohkuma T, Tanaka S, Ikekawa T. Augmentation of host's immunity by combined cryodestruction of sarcoma 180 and administration of protein-bound polysaccharide, EA6, isolated from *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. in ICR mice [J]. *J Pharmacobiodyn*, 1983, 6(2): 88-95.
- [4] 吴希哲(Wu XZ), 高向东(Gao XD). 金针菇提取物的保肝及抗肿瘤作用 [J]. 中国生化药物杂志 (*Chin J Biochem Pharm*) 2002, 23(4): 176-178.
- [5] 刘冬(Liu D), 姚文兵(Yao WB), 张健(Zhang J), 等. 富锗金针菇多糖对小鼠肝脏的保护作用 [J]. 中国药科大学学报 (*J China Pharm Univ*) 2004, 35(4): 565-568.
- [6] 张健(Zhang J), 姚文兵(Yao WB), 谢晨(Xie C), 等. 富锗金针菇多糖肝保护有效成分的研究 [J]. 中国生化药物杂志 (*Chin J Biochem Pharm*) 2007, 28(6): 366-367.
- [7] Needs PW, Selvendran RR. Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide [J]. *Carbohydr Res*, 1993, 245(1): 1-10.
- [8] Arnosti C. Fluorescent derivatization of polysaccharides and carbohydrate-containing biopolymers for measurement of enzyme activities in complex media [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 793(1): 181-191.
- [9] Matsumoto T, Yamada H. Regulation of immune complexes binding of macrophages by pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L.: pharmacological evidence for the requirement of intracellular calcium/calmodulin on Fc receptor up-regulation by bupleuran 2IIb [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47(2): 152-156.
- [10] Lee KY, Jeon YJ. Polysaccharide isolated from *Poria cocos* sclerotium induces NF-kappaB/Rel activation and iNOS expression in murine macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(10/11): 1353-1362.
- [11] Yu Z, Zhao L, Ke H. Potential role of nuclear factor-kappaB in the induction of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by oligochitosan in macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(2): 193-200.